

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 4月22日

出願番号
Application Number: 特願2003-117604
[ST. 10/C]: [JP2003-117604]

出願人
Applicant(s): 小野薬品工業株式会社

REC'D 27 NOV 2003

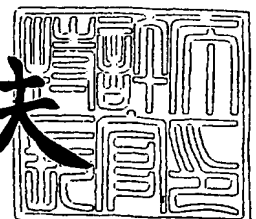
WIPO POT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3088748

【書類名】 特許願

【整理番号】 APJP-13

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町桜井三丁目 1 番 1 号 小野薬品工業株式会社内

 【氏名】 酒井 芳紀

【特許出願人】

 【識別番号】 000185983

 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 1 番 5 号

 【氏名又は名称】 小野薬品工業株式会社

 【代表者】 松本 公一郎

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 029595

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 内因性修復因子産生促進剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プロスタグランジン (PG) I 2 アゴニストを有効成分とする内因性修復因子産生促進剤。

【請求項 2】 内因性修復因子産生が血管新生である請求項 1 記載の剤。

【請求項 3】 内因性修復因子が血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子または上皮細胞増殖因子である請求項 1 記載の剤。

【請求項 4】 持続性製剤である請求項 1 記載の剤。

【請求項 5】 持続性製剤がマイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤、ナノスフェア製剤、フィルム製剤、軟膏剤またはコーティング剤である請求項 4 記載の剤。

【請求項 6】 局所部位投与剤である請求項 1 記載の剤。

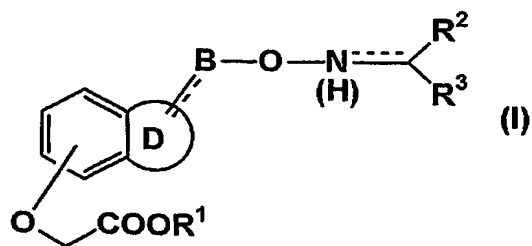
【請求項 7】 局所部位が虚血部位または障害部位である請求項 6 記載の剤。

【請求項 8】 虚血性臓器障害の予防・治療剤である請求項 2 記載の剤。

【請求項 9】 虚血性臓器障害が閉塞性動脈硬化症、バージャー病、レイノー病、心筋梗塞、狭心症、糖尿病性神経障害、脊柱管狭窄症、脳血管障害、脳梗塞、またはパーキンソン病である請求項 8 記載の剤。

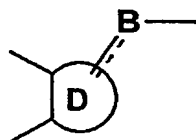
【請求項 10】 プロスタグランジン (PG) I 2 アゴニストが、一般式 (I)

【化 1】



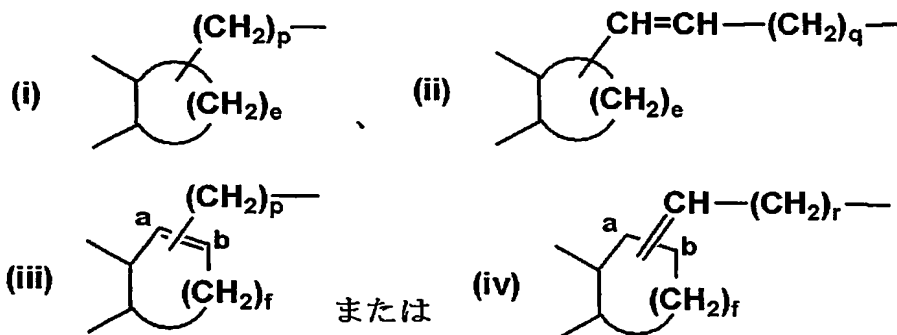
(式中、

【化 2】



は

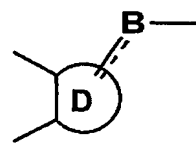
【化 3】



を表わし、 R^1 は水素原子または C 1-4 アルキル基を表わし、 R^2 は (i) 水素原子、(ii) C 1-8 アルキル基、(iii) フェニル基または C 4-7 シクロアルキル基、(iv) 窒素原子 1 個を含む 4-7 員単環、(v) ベンゼン環または C 4-7 シクロアルキル基で置換されている C 1-4 アルキル基、または (vi) 窒素原子 1 個を含む 4-7 員単環で置換されている C 1-4 アルキル基を表わし、 R^3 は (i) C 1-8 アルキル基、(ii) フェニル基または C 4-7 シクロアルキル基、(iii) 窒素原子 1 個を含む 4-7 員単環、(iv) ベンゼン環または C 4-7 シクロアルキル基で置換されている C 1-4 アルキル基、または

(v) 窒素原子 1 個を含む 4-7 員単環で置換されている C 1-4 アルキル基を表わし、 e は 3-5 の整数を表わし、 f は 1-3 の整数を表わし、 p は 1-4 の整数を表わし、 q は 1 または 2 を表わし、 r は 1-3 の整数を表わす。ただし、

【化 4】



が (iii) または (iv) を表わされる基である場合には $-(CH_2)_p-$ お

よび $\text{CH}-(\text{CH}_2)_s-$ は、環上のaまたはbの位置に結合するものとし、 R^2 および R^3 中の環は、1個から3個のC1~4アルキル基、C1~4アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはトリハロメチル基で置換されていてもよいとする。)で示されるオキシム誘導体またはその非毒性塩である請求項1記載の剤。

【請求項11】一般式(I)で示されるオキシム誘導体が1) (E)-[5-[2-[1-フェニル-1-(3-ピリジル)メチリデンアミノオキシ]エチル]-7,8-ジヒドロナフタレン-1-イルオキシ酢酸、または2) (Z)-[5-[2-[1-フェニル-1-(3-ピリジル)メチリデンアミノオキシ]エチル]-7,8-ジヒドロナフタレン-1-イルオキシ酢酸である請求項10記載の剤。

【請求項12】プロスタグランジン(PG)I₂アゴニストが1) (±)-(1R, 2R, 3aS, 8bS)-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-2-ヒドロキシ-1-[(E)-(3S, 4RS)-3-ヒドロキシ-4-メチル-1-オクテン-6-イニル]-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-5-ブタン酸・ナトリウム塩、2) 5-{(3aR, 4R, 6aS)-5-ヒドロキシ-4-[(1E, 3R)-3-ヒドロキシ-3-(4-プロピルシクロヘキシル)プロプ-1-エニル]-3,3a,4,5,6,6a-ヘキサヒドロシクロペンタ[b]ピロール-2-イル}ペンタン酸・メチルエステル、または3) (5E)-5-[(3aS, 4R, 5R, 6aS)-4-[(1E, 3S)-3-シクロペンチル-3-ヒドロキシプロプ-1-エニル]-5-ヒドロキシヘキサヒドロペンタレン-2(1H)-イリデン}ペンタン酸である請求項1記載の剤。

【請求項13】臓器障害の予防・治療剤である請求項1記載の剤。

【請求項14】哺乳動物に有効量のプロスタグランジン(PG)I₂アゴニストを投与することを特徴とする内因性修復因子産生を促進する方法。

【請求項15】哺乳動物に有効量のプロスタグランジン(PG)I₂アゴニストを投与することを特徴とする臓器障害の予防・治療方法。

【請求項16】哺乳動物に有効量のプロスタグランジン(PG)I₂アゴニストを投与することを特徴とする血管新生を促進する方法。

【請求項 17】哺乳動物に有効量のプロスタグランジン（PG）I2 アゴニストを投与することを特徴とする虚血性臓器障害の予防・治療方法。

【請求項 18】内因性修復因子産生促進剤を製造するためのプロスタグランジン（PG）I2 アゴニストの使用。

【請求項 19】臓器障害の予防・治療剤を製造するためのプロスタグランジン（PG）I2 アゴニストの使用。

【請求項 20】血管新生促進剤を製造するためのプロスタグランジン（PG）I2 アゴニストの使用。

【請求項 21】虚血性臓器障害の予防・治療剤を製造するためのプロスタグランジン（PG）I2 アゴニストの使用。

【請求項 22】

抗血栓薬および内因性修復因子の遺伝子から選ばれる 1 種または 2 種の剤と組み合わせてなる請求項 1 記載の剤。

【請求項 23】プロスタグランジン（PG）I2 アゴニストを有効成分とする虚血性臓器障害の予防・治療剤。

【請求項 24】プロスタグランジン（PG）I2 アゴニストを有効成分とする臓器障害の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プロスタグランジン（以下、PG と略す。）I2 アゴニストを有効成分とする内因性修復因子産生促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

再生医療は血管、肝臓、腎臓、肺臓、脾臓、および骨や骨格筋細胞、心筋細胞、および神経細胞等の組織・細胞障害時の再生療法として注目されている。自己修復系には、肝、腎などの多くの実質臓器の再生の様に成熟細胞の細胞分裂により達成される系（simple duplication system）と造血細胞の再生の様に、幹細胞増殖を介した系（stem cell system）とがある。血管新生（再生）にはこれら

の2つの系が存在すると言われており、これらは、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor: 血管内皮細胞増殖因子)、HGF (Hepatocellular Growth Factor: 肝細胞増殖因子)、FGF (Fibroblast Growth Factor: 線維芽細胞増殖因子)、およびEGF (Epidermal Growth Factor: 上皮細胞増殖因子) 等の内因性修復因子放出による系と骨髄細胞等からの血管前駆細胞 (stem cell) が血管を形成する系とがある。

【0003】

これらの内因性修復因子の産生が促進されることにより、各種臓器障害の予防・治療 (修復再生) が促進されることが知られている。例えば、HGFは細胞増殖促進作用、形態形成誘導作用、遊走促進作用、抗アポトーシス作用等を有していることから、肝疾患 (劇症肝炎、急性肝炎、肝硬変、脂肪肝等)、腎疾患 (急性腎不全、慢性腎不全等)、肺疾患 (急性肺炎、肺線維症、肺高血圧症等)、脾疾患 (糖尿病、慢性脾炎等) 骨疾患 (変形性関節炎、関節リウマチ、骨粗鬆症等)、消化器疾患 (胃潰瘍、十二指腸潰瘍、潰瘍性大腸炎、クローン病等)、神経変性疾患 (脳卒中、パーキンソン病、アルツハイマー病、脊柱管狭窄症等)、糖尿病性合併症 (神経障害、皮膚潰瘍、腎症、網膜症等)、血管内皮細胞障害 (PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty: 経皮経管冠動脈形成術) 後の再狭窄等)、褥瘡、脱毛等の予防および/または治療に有効であることが知られている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 639-644 (1997)等参照)。

【0004】

内因性修復因子を介した再生療法は、血管新生 (再生) 療法や肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、中枢/末梢神経、血管および骨等の臓器・組織障害時における組織再生療法として注目されている。特に治療法のない、重症の虚血性臓器障害の再生治療として注目され、幾つかの方法が閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans; 以下、ASOと略す。)、バージャー病、レイノー病、心筋梗塞、狭心症、糖尿病性神経障害、脊柱管狭窄症、脳血管障害、脳梗塞、またはパーキンソン病等に対して検討されている。

【0005】

例えば、ASOやバージャー病に代表される閉塞性末梢血管障害の患者は間歇性跛行、安静時疼痛および下肢の潰瘍・壊死を呈し、最終的には下肢切断を余儀無くされる。しかし、現在、これらの重傷ASO患者に対しては有効な治療法がない。重症ASO患者はPGE1の静脈内投与やシロスタゾールの経口剤である血管拡張剤や血小板凝集抑制剤で効果を示さず、血管内治療（バルーン拡張術、ステント挿入）や血行再建手術ができない。最近、このような患者に対してVEGF遺伝子およびHGF遺伝子の下肢虚血部位への筋肉内投与による遺伝子治療（Circulation., 97, 1114-1123 (1998)およびGene Therapy., 8, 181-189 (2001)参照）が臨床応用され、その効果が注目されている。

【0006】

また、患者自身の骨髓から分離した血管前駆（幹）細胞を直接下肢虚血部位へ筋肉内投与することによる血管新生療法が注目され、幾つかの大学病院で実施され、注目されている（THE LANCET 360, 427-435 (2002)参照）。心筋梗塞、狭心症においても、低侵襲の血管カテーテルにて梗塞部位に直接これらの遺伝子や前駆細胞を導入することが可能となり、血管新生療法として臨床応用されつつある。また、虚血性脳血管障害においても、大槽から髄液を介した脳へのベクターを用いた遺伝子治療等も試みられている。これらの治療は虚血領域への側副血行路の発達を即す治療的血管新生（再生）療法である。しかしながら、これらの遺伝子治療や細胞治療の臨床応用には、倫理面、安全性（免疫、感染、癌等）、汎用性、および経済性等において問題点も多い。

【0007】

心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、および動脈硬化等における血管閉塞時の再開通治療として、PTCA（経皮経管冠動脈形成術）が施行され良好な結果が得られている。しかし、バルーンによる強制的血管拡張やステント留置等により閉塞近傍の血管内皮細胞が損傷されることにより再狭窄が惹起されることが知られている。再狭窄予防法として、血小板凝集抑制剤等が投与されているが、なお満足される状況ではない。最近、抗生物質、制癌剤（ラパマイシン等）、および β 線等のラジオアイソトープ製剤をコーティングしたステントが開発され、再狭窄予防に対して良好な結果を得ている。しかし、これらの方法もコーティングされた薬剤の消

失時や、ステント近傍の血管内皮細胞増殖による損傷修復がこれらの薬剤で抑制されるため、長期的には問題点も多い。よって、血管内皮細胞損傷部位局所での血小板凝集抑制作用、および血管内皮細胞増殖による損傷修復作用を促進する薬剤が期待される。

【0008】

一方、プロスタグランジン (PG) I₂ は、アラキドン酸カスケードと呼ばれる生体内代謝経路において PGH₂ より生合成される天然生理活性物質である。PGI₂ は極めて強力な血小板凝集抑制作用をはじめ、血小板粘着抑制、血管拡張、胃酸分泌抑制等の作用を有していることが知られている。

【0009】

例えば、PGI₂ アゴニストとして本発明で使用する後記一般式 (I) で示されるオキシム誘導体またはその非毒性塩 (特許文献 1 参照) は、血小板凝集抑制、血小板粘着抑制、血管拡張、胃酸分泌抑制作用を有していることから、血栓症、動脈硬化、虚血性心疾患、胃潰瘍、高血圧等の予防および／または治療に有用である旨、特開平 6-87811 号明細書で開示されているが、内因性修復因子産生促進作用に基づいて血管内皮細胞および血管平滑筋細胞増殖作用を発揮することによる血管新生作用に関する記載、およびこれらの内因性修復因子産生促進作用により、各種細胞、および臓器障害の予防・治療 (修復再生) 作用に関する記載は全くないし、示唆もされていない。

【0010】

また、Diabetologia., 40, 1053-1061 (1997) では、PGI₂ 誘導体であるベラプロスト (Beraprost; (±) - (1R, 2R, 3aS, 8bS) - 2, 3, 3a, 8b-テトラヒドロ-2-ヒドロキシ-1-[(E) - (3S, 4RS) - 3-ヒドロキシ-4-メチル-1-オクテン-6-イニル] - 1H-シクロペンタ [b] ベンゾフラン-5-ブタン酸・ナトリウム塩; 非特許文献 1 参照) が、in vitroにおいて、血管内皮細胞での HGF 産生を上昇させ、内皮細胞増殖作用を示すことが報告されているが、ベラプロストの持続性製剤を局所投与することによる血管新生促進作用や各種臓器障害の予防・治療に有効である旨の記載はない。

【0011】

【非特許文献1】

Diabetologia., 40, 1053-1061 (1997)

【特許文献1】

特開平6-87811号明細書

【0012】

【発明が解決しようとする課題】 (虚血性) 臓器障害の予防・治療剤として有用であり、副作用の少ない内因性修復因子産生促進剤や血管新生促進剤の開発が切望されている。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは(虚血性) 臓器障害の予防・治療のために有用である、内因性修復因子産生促進剤や血管新生促進剤を見出すべく鋭意研究を行なった結果、プロスタグランジン(PG) I₂ アゴニスト、例えば、一般式(I)で示されるオキシム誘導体またはその非毒性塩が目的を達成することを見出し、発明を完成した。

【0014】

また、本発明者らは、PGI₂ アゴニスト(例えば、一般式(I)で示されるオキシム誘導体またはその非毒性塩等)を、血管新生を必要とする虚血部位に局所投与することができれば、全身投与における副作用の少ない薬剤が創製可能であると考えた。さらに、虚血部位近傍局所において、血管新生(再生)が起こる期間の持続放出製剤化が可能であれば、全身投与における副作用が少なく、かつ投与回数の少ない薬剤が創製可能であると考えた。

【0015】

なお、血管新生作用は一般的には1週間～6ヶ月、さらに好ましくは、1週間～8週間の期間が必要とされており、その間虚血部位での持続的な有効成分の放出が必要である。また、PGI₂ アゴニストは、血管新生促進作用に加えて、血管拡張作用および血小板凝集抑制作用も有しており、これらの作用が加わることにより、さらに虚血性臓器障害に対して強い予防および/または治療効果を示す

と考えた。

【0016】

そこで、本発明者らは、鋭意研究を行なった結果、例えば、一般式 (I) で示されるオキシム誘導体またはその非毒性塩の持続性製剤が、上記目的を達成することも見出し、本発明を完成した。

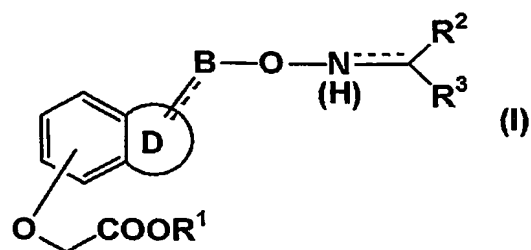
【0017】

すなわち、本発明は

- (1) プロスタグランジン (PG) I₂ アゴニストを有効成分とする内因性修復因子産生促進剤、
- (2) 内因性修復因子産生が血管新生である前項 (1) 記載の剤、
- (3) 内因性修復因子が血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子または上皮細胞増殖因子である前項 (1) 記載の剤、
- (4) 持続性製剤である前項 (1) 記載の剤、
- (5) 持続性製剤がマイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤、ナノスフェア製剤、フィルム製剤、軟膏剤またはコーティング剤である前項 (4) 記載の剤、
- (6) 局所部位投与剤である前項 (1) 記載の剤、
- (7) 局所部位が虚血部位または障害部位である前項 (6) 記載の剤、
- (8) 虚血性臓器障害の予防・治療剤である前項 (2) 記載の剤、
- (9) 虚血性臓器障害が閉塞性動脈硬化症、バージャー病、レイノー病、心筋梗塞、狭心症、糖尿病性神経障害、脊柱管狭窄症、脳血管障害、脳梗塞、またはパーキンソン病である前項 (8) 記載の剤、
- (10) プロスタグランジン (PG) I₂ アゴニストが、一般式 (I)

【0018】

【化5】

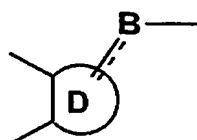


【0019】

(式中、

【0020】

【化6】

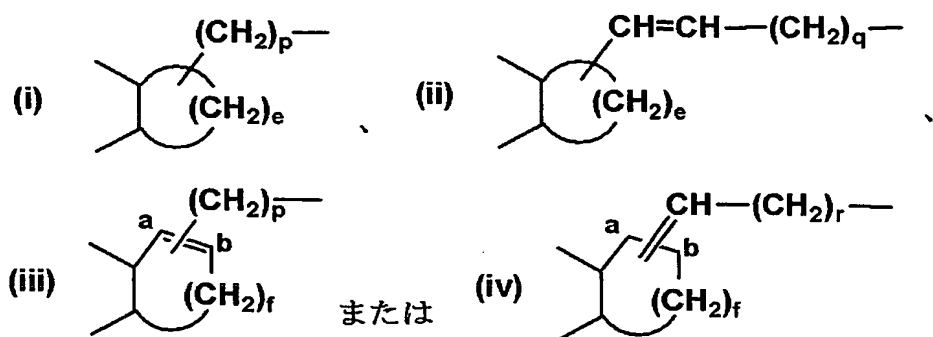


【0021】

は

【0022】

【化7】



【0023】

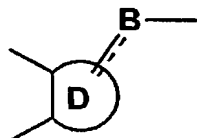
を表わし、 R^1 は水素原子またはC1-4アルキル基を表わし、 R^2 は (i) 水素原子、(ii) C1-8アルキル基、(iii) フェニル基またはC4-7シクロアルキル基、(iv) 窒素原子1個を含む4-7員単環、(v) ベンゼン環またはC4-7シクロアルキル基で置換されているC1-4アルキル基、または (vi) 窒素原子1個を含む4-7員単環で置換されているC1-4アルキル基

を表わし、 R^3 は(i) C1-8アルキル基、(ii) フェニル基またはC4-7シクロアルキル基、(iii) 窒素原子1個を含む4-7員単環、(iv) ベンゼン環またはC4-7シクロアルキル基で置換されているC1-4アルキル基、または

(v) 窒素原子1個を含む4-7員単環で置換されているC1-4アルキル基を表わし、eは3-5の整数を表わし、fは1-3の整数を表わし、pは1-4の整数を表わし、qは1または2を表わし、rは1-3の整数を表わす、ただし、

【0024】

【化8】



【0025】

が(iii)または(iv)を表わされる基である場合には $-(CH_2)_p-$ および $=CH-(CH_2)_s-$ は、環上のaまたはbの位置に結合するものとし、 R^2 および R^3 中の環は、1個から3個のC1-4アルキル基、C1-4アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基またはトリハロメチル基で置換されていてもよいとする、)で示されるオキシム誘導体またはその非毒性塩である前項(1)記載の剤、

(11) 一般式(I)で示されるオキシム誘導体が1) (E)-[5-[2-[1-フェニル-1-(3-ピリジル)メチリデンアミノオキシ]エチル]-7,8-ジヒドロナフタレン-1-イルオキシ酢酸、または2) (Z)-[5-[2-[1-フェニル-1-(3-ピリジル)メチリデンアミノオキシ]エチル]-7,8-ジヒドロナフタレン-1-イルオキシ酢酸である前項(10)記載の剤、

(12) プロスタグランジン(PG)I₂アゴニストが1) (±)-(1R, 2R, 3aS, 8bS)-2,3,3a,8b-テトラヒドロ-2-ヒドロキシ-1-[(E)-(3S, 4RS)-3-ヒドロキシ-4-メチル-1-オクテン-6-イニル]-1H-シクロペンタ[b]ベンゾフラン-5-ブタン酸・ナト

リウム塩、2) 5- { (3 a R, 4 R, 6 a S) - 5-ヒドロキシ-4- [(1 E, 3 R) - 3-ヒドロキシ-3- (4-プロピルシクロヘキシル) プロプ-1-エニル] - 3, 3 a, 4, 5, 6, 6 a-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] ピロール-2-イル] ペンタン酸・メチルエステル、または3) (5 E) - 5- [(3 a S, 4 R, 5 R, 6 a S) - 4- [(1 E, 3 S) - 3-シクロペンチル-3-ヒドロキシプロプ-1-エニル] - 5-ヒドロキシヘキサヒドロペンタレン-2 (1 H) -イリデン] ペンタン酸である前項 (1) 記載の剤、

(13) 臓器障害の予防・治療剤である前項 (1) 記載の剤、

(14) 哺乳動物に有効量のプロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストを投与することを特徴とする内因性修復因子産生を促進する方法、

(15) 哺乳動物に有効量のプロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストを投与することを特徴とする臓器障害の予防・治療方法、

(16) 哺乳動物に有効量のプロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストを投与することを特徴とする血管新生を促進する方法、

(17) 哺乳動物に有効量のプロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストを投与することを特徴とする虚血性臓器障害の予防・治療方法、

(18) 内因性修復因子産生促進剤を製造するためのプロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストの使用、

(19) 臓器障害の予防・治療剤を製造するためのプロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストの使用、

(20) 血管新生促進剤を製造するためのプロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストの使用、

(21) 虚血性臓器障害の予防・治療剤を製造するためのプロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストの使用、

(22)

抗血栓薬および内因性修復因子の遺伝子から選ばれる1種または2種の剤と組み合わせる前項 (1) 記載の剤、

(23) プロスタグランジン (P G) I 2 アゴニストを有効成分とする虚血性臓器障害の予防・治療剤、

(24) プロスタグランジン (PG) I₂ アゴニストを有効成分とする臓器障害の予防・治療剤に関する。

【0026】

本明細書中、C₁－4 アルキル基とは、メチル、エチル、プロピル、ブチル基およびそれらの異性体である。

【0027】

本明細書中、C₁－8 アルキル基とは、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル基およびそれらの異性体である。

【0028】

本明細書中、C₄－7 シクロアルキル基とは、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルおよびシクロヘプチル基である。

【0029】

本明細書中、窒素原子 1 個を含む 4－7 員単環とは、アゼート、アゾール、ピリジン、アゼピン環およびこれらの環の一部または全部が飽和した環である。

【0030】

本発明においては、特に指示しない限り異性体はこれをすべて包含する。例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アルキレン基、アルケニレン基、アルキニレン基には直鎖のものおよび分枝鎖のものが含まれる。さらに、二重結合、環、縮合環における異性体 (E、Z、シス、トランス体)、不斉炭素の存在等による異性体 (R、S 体、 α 、 β 配置、エナンチオマー、ジアステレオマー)、旋光性を有する光学活性体 (D、L、d、l 体)、クロマトグラフ分離による極性体 (高極性体、低極性体)、平衡化合物、回転異性体、これらの任意の割合の混合物、ラセミ混合物は、すべて本発明に含まれる。

【0031】

本発明においては、特に断わらない限り、当業者にとって明らかなように記号

【0032】

【化9】

【0033】

は紙面の向こう側（すなわち α -配置）に結合していることを表し、

【0034】

【化10】

【0035】

は紙面の手前側（すなわち β -配置）に結合していることを表し、

【0036】

【化11】

【0037】

は α -配置、 β -配置またはそれらの混合物であることを表し、

【0038】

【化12】

【0039】

は、 α -配置と β -配置の混合物であることを表す。

【0040】

本発明化合物は、公知の方法で非毒性塩に変換される。

【0041】

非毒性塩は薬学的に許容され、水溶性のものが好ましい。

【0042】

本発明化合物の非毒性塩としては、例えば、アルカリ金属（カリウム、ナトリウム、リチウム等）の塩、アルカリ土類金属（カルシウム、マグネシウム等）の塩、アンモニウム塩（テトラメチルアンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩等）、有機アミン（トリエチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、シクロペンチルアミン、ベンジルアミン、フェネチルアミン、ピペリジン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン、リジン、アルギニン、N-メチル-D-グルカミン等）の塩、酸付加物塩（無

機酸塩（塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩等）、有機酸塩（酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、グルクロン酸塩、グルコン酸塩等）等）が挙げられる。

【0043】

本発明化合物の非毒性塩には、溶媒和物、または上記本発明化合物のアルカリ（土類）金属塩、アンモニウム塩、有機アミン塩、酸付加物塩の溶媒和物も含まれる。

【0044】

溶媒和物は非毒性かつ水溶性であることが好ましい。適当な溶媒和物としては、例えば水、アルコール系溶媒（エタノール等）等の溶媒和物が挙げられる。

【0045】

本明細書中、好ましい態様としては、プロスタグランジン（PG）I2アゴニストの持続性製剤を有効成分として含有する、虚血性臓器障害の予防および／または治療剤が好ましく、さらに好ましくは、プロスタグランジン（PG）I2アゴニストの持続性製剤を虚血部位に局所投与することによる、虚血性臓器障害の予防および／または治療剤である。

【0046】

本明細書中、プロスタグランジン（PG）I2アゴニストとしては、現在までに知られているPGI2アゴニストや今後見出されるPGI2アゴニストをすべて包含する。

【0047】

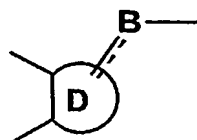
例えば、PGI2アゴニストとして、一般式（I）で示されるオキシム誘導体またはその非毒性塩が好ましい。

【0048】

さらに一般式（I）中、

【0049】

【化13】

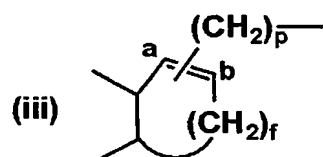


【0050】

として好ましくは、

【0051】

【化14】



【0052】

である。

【0053】

一般式 (I) 中、 R^2 として好ましくは、(iii) フェニル基または C4～7シクロアルキル基、(iv) 窒素原子1個を含む4～7員単環、(v) ベンゼン環または C4～7シクロアルキル基で置換されている C1～4 アルキル基、または (vi) 窒素原子1個を含む4～7員単環で置換されている C1～4 アルキル基であり、特に好ましくは、(iii) フェニル基または C4～7シクロアルキル基、または (iv) 窒素原子1個を含む4～7員単環である。

【0054】

一般式 (I) 中、 R^3 として好ましくは、(ii) フェニル基または C4～7シクロアルキル基、(iii) 窒素原子1個を含む4～7員単環、(iv) ベンゼン環または C4～7シクロアルキル基で置換されている C1～4 アルキル基、または (v) 窒素原子1個を含む4～7員単環で置換されている C1～4 アルキル基であり、特に好ましくは、(ii) フェニル基または C4～7シクロアルキル基、または (iii) 窒素原子1個を含む4～7員単環である。

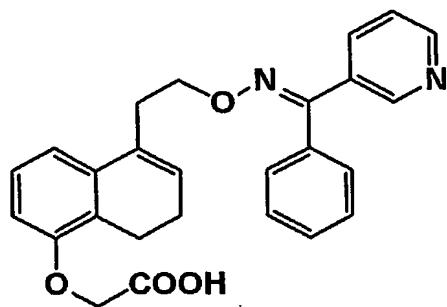
【0055】

さらに、より好ましくは

化合物 1: (E) - [5 - [2 - [1 - フェニル - 1 - (3 - ピリジル) メチリ
デンアミノオキシ] エチル] - 7, 8 - ジヒドロナフタレン - 1 - イルオキシ酢
酸

【0056】

【化15】

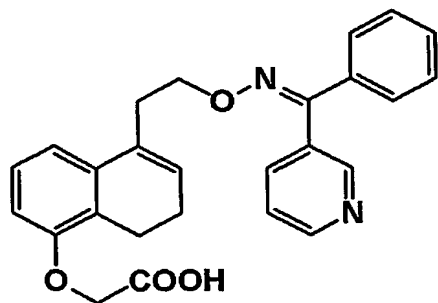


【0057】

化合物 2: (Z) - [5 - [2 - [1 - フェニル - 1 - (3 - ピリジル) メチリ
デンアミノオキシ] エチル] - 7, 8 - ジヒドロナフタレン - 1 - イルオキシ酢
酸

【0058】

【化16】



【0059】

が挙げられる。

【0060】

また、他の PGI₂ アゴニストとしては、(±) - (1R, 2R, 3aS, 8bS) - 2, 3, 3a, 8b - テトラヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - [(E) - (3S, 4RS) - 3 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1 - オクテン - 6 - イニル]

ー1H-シクロペンタ [b] ベンゾフランー5-ブタン酸・ナトリウム塩、5-
{ (3aR, 4R, 6aS) -5-ヒドロキシ-4- [(1E, 3R) -3-ヒ
ドロキシ-3- (4-プロピルシクロヘキシル) プロプー1-エニル] -3, 3
a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] ピロールー2-イル]
ペンタン酸・メチルエステル、および (5E) -5- [(3aS, 4R, 5R,
6aS) -4- [(1E, 3S) -3-シクロペンチル-3-ヒドロキシプロプ
ー1-エニル] -5-ヒドロキシヘキサヒドロペンタレンー2 (1H) -イリデ
ン] ペンタン酸が好ましい。

【0061】

【本発明に係る化合物の製造方法】

本発明で用いるPGI2アゴニストのうち、例えば、一般式(I)で示される
化合物の製造方法は、特開平6-87811号明細書に開示されている。例えば
、(E) - [5- [2- [1-フェニル-1- (3-ピリジル) メチリデンアミ
ノオキシ] エチル] -7, 8-ジヒドロナフタレンー1-イルオキシ酢酸 (化
合物1) は、実施例2 (g) に記載されている。

【0062】

また、(Z) - [5- [2- [1-フェニル-1- (3-ピリジル) メチリデ
ンアミノオキシ] エチル] -7, 8-ジヒドロナフタレンー1-イルオキシ酢酸
(化合物2) は、実施例2 (f) に記載されている。

【0063】

(±) - (1R, 2R, 3aS, 8bS) -2, 3, 3a, 8b-テトラヒド
ロ-2-ヒドロキシ-1- [(E) - (3S, 4RS) -3-ヒドロキシ-4-
メチル-1-オクテンー6-イニル] -1H-シクロペンタ [b] ベンゾフラン
ー5-ブタン酸・ナトリウム塩の製造方法は、特開昭62-134787号明細
書に開示されている。

【0064】

5- { (3aR, 4R, 6aS) -5-ヒドロキシ-4- [(1E, 3R) -
3-ヒドロキシ-3- (4-プロピルシクロヘキシル) プロプー1-エニル] -
3, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ [b] ピロールー2-

イル] ペンタン酸・メチルエステルの製造方法は、特開昭61-30519号明細書に開示されている。

【0065】

(5E)-5-[(3aS, 4R, 5R, 6aS)-4-[(1E, 3S)-3-シクロペンチル-3-ヒドロキシプロプ-1-エニル]-5-ヒドロキシヘキサヒドロペンタレン-2(1H)-イリデン] ペンタン酸の製造方法は、特開昭54-130543号明細書に記載されている。

【0066】

【医薬品への適用】

PGI₂アゴニスト（例えば、一般式（I）で示されるオキシム誘導体またはその非毒性塩等）は、血管新生促進作用を有しているため、虚血性臓器障害（閉塞性動脈硬化症、バージャー病、レイノー病、心筋梗塞、狭心症、糖尿病性神経障害、脊柱管狭窄症、脳血管障害、脳梗塞、パーキンソン病等）の予防・治療剤として有用である。またPGI₂アゴニスト（例えば、一般式（I）で示される化合物またはその非毒性塩等）は、内因性修復因子促進作用を有しているため、各種臓器障害（肝疾患（劇症肝炎、急性肝炎、肝硬変、脂肪肝等）、腎疾患（急性腎不全、慢性腎不全等）、肺疾患（急性肺炎、肺線維症、肺高血圧症等）、脾疾患（糖尿病、慢性脾炎等）骨疾患（変形性関節炎、関節リウマチ、骨粗鬆症等）、消化器疾患（胃潰瘍、十二指腸潰瘍、潰瘍性大腸炎、クローン病等）、神経変性疾患（脳卒中、パーキンソン病、アルツハイマー病、脊柱管狭窄症等）、糖尿病性合併症（神経障害、皮膚潰瘍、腎症、網膜症等）、血管内皮細胞障害（PTCA後の再狭窄等）、褥瘡、脱毛等）の予防・治療剤として有用である。

【0067】

本発明の剤は、

- 1) 該本発明の剤の予防および／または治療効果の補完および／または増強、
 - 2) 該本発明の剤の動態・吸収改善、投与量の低減、
および／または
 - 3) 該本発明の剤の副作用の軽減
- のために他の薬剤と組み合わせて、併用剤として投与してもよい。

【0068】

本発明の剤と他の薬剤の併用剤は、1つの製剤中に両成分を配合した配合剤の形態で投与してもよく、また別々の製剤にして投与する形態をとってもよい。この別々の製剤にして投与する場合には、同時投与および時間差による投与が含まれる。また、時間差による投与は、本発明の剤を先に投与し、他の薬剤を後に投与してもよいし、他の薬剤を先に投与し、本発明の剤を後に投与してもかまわず、それぞれの投与方法は同じでも異なってもよい。

【0069】

該他の薬剤は、低分子化合物であってもよく、また高分子の蛋白、ポリペプチド、ポリヌクレオチド（DNA、RNA、遺伝子）、アンチセンス、デコイ、抗体であるか、またはワクチン等であってもよい。他の薬剤の投与量は、臨床上用いられている用量を基準として適宜選択することができる。また、本発明の剤と他の薬剤の配合比は、投与対象の年齢および体重、投与方法、投与時間、対象疾患、症状、組み合わせなどにより適宜選択することができる。例えば、本発明の剤1重量部に対し、他の薬剤を0.01乃至100重量部用いればよい。他の薬剤は任意の2種以上を適宜の割合で組み合わせて投与してもよい。また、本発明の剤の予防および／または治療効果を補完および／または増強する他の薬剤には、上記したメカニズムに基づいて、現在までに見出されているものだけでなく今後見出されるものも含まれる。

【0070】

上記併用剤により、予防および／または治療効果を奏する疾患は特に限定されず、本発明の剤の予防および／または治療効果を補完および／または増強する疾患であればよい。

【0071】

他の薬剤としては、例えば、抗血栓薬、プロスタグランジン誘導体、内因性修復因子、幹細胞等が挙げられる。

【0072】

抗血栓薬としては、例えば、ヘパリン製剤（ヘパリンナトリウム、ヘパリンカルシウム、ダルテパンナトリウム等）、経口抗凝固薬（ワーファリンカリウム等

）、抗トロンビン薬（メシル酸ガベキサート、メシル酸ナファモスタット、アルガトロバン等）、抗血小板凝集抑制薬（アスピリン、ジピリダモール、塩酸チクロピジン、ベラプロストナトリウム、シロスタゾール、オザグレルナトリウム、塩酸サルボグレラート、イコサペント酸エチル等）、血栓溶解薬（ウロキナーゼ、チソキナーゼ、アルテプララーゼ、ナテプララーゼ、モンテプララーゼ、パミテプララーゼ等）、ファクターXa阻害薬、ファクターVIIa阻害薬等が挙げられる。

【0073】

プロスタグランジン製剤としては、例えば、PGE1、リポPGE1、オルノプロスチル、ミソプロストール、リマプロストアルファデクス等が挙げられる。

【0074】

内因性修復因子としては、例えば、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子または上皮細胞増殖因子等の蛋白や遺伝子が挙げられる。

【0075】

他の薬剤として好ましくは、抗血小板凝集抑制薬、プロスタグランジン誘導体である。

【0076】

本発明の剤、または本発明の剤と他の薬剤の併用剤を上記の目的で用いるには、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。

【0077】

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人当たり、一回につき、1 ngから100 mgの範囲で一日一回から数回経口投与されるか、または成人一人当たり、一回につき、0.1 ngから50 mgの範囲で一日一回から数回、一週に一回から数回、または三ヶ月に一回から数回程度持続性製剤を非経口投与されるか、または一日1時間から24時間の範囲で静脈内に持続投与される。

【0078】

もちろん前記したように、投与量は種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて投与の必要な場合もある。

【0079】

本発明の剤、または本発明の剤と他の薬剤の併用剤を投与する際には、経口投与のための内服用固形剤、内服用液剤および、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤、点眼剤、吸入剤等として用いられる。

【0080】

経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。

【0081】

このような内服用固形剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質はそのままか、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また2以上の層で被覆していてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

【0082】

経口投与のための内服用液剤は、薬剤的に許容される水剤、懸濁剤・乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

【0083】

非経口投与のための外用剤の剤形には、例えば、軟膏剤、ゲル剤、クリーム剤、湿布剤、貼付剤、リニメント剤、噴霧剤、吸入剤、スプレー剤、点眼剤、およ

び点鼻剤等が含まれる。これらはひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、公知の方法または通常使用されている処方により製造、調製される。

【0084】

軟膏剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に研和、または溶解させて製造、調製される。軟膏基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。例えば、高級脂肪酸または高級脂肪酸エステル（アジピン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、アジピン酸エステル、ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、ステアリン酸エステル、オレイン酸エステル等）、ロウ類（ミツロウ、鯨ロウ、セレシン等）、界面活性剤（ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸エステル等）、高級アルコール（セタノール、ステアリルアルコール、セトステアリルアルコール等）、シリコン油（ジメチルポリシロキサン等）、炭化水素類（親水ワセリン、白色ワセリン、精製ラノリン、流動パラフィン等）、グリコール類（エチレングリコール、ジエチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、マクロゴール等）、植物油（ヒマシ油、オリーブ油、ごま油、テレピン油等）、動物油（ミンク油、卵黄油、スクワラン、スクワレン等）、水、吸収促進剤、かぶれ防止剤から選ばれるもの単独または2種以上を混合して用いられる。さらに、保湿剤、保存剤、安定化剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでいてもよい。

【0085】

ゲル剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に溶解させて製造、調製される。ゲル基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。例えば、低級アルコール（エタノール、イソプロピルアルコール等）、ゲル化剤（カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、エチルセルロース等）、中和剤（トリエタノールアミン、ジイソプロパノールアミン等）、界面活性剤（モノステアリン酸ポリエチレングリコール等）、ガム類、水、吸収促進剤、かぶれ防止剤から選ばれるもの単独または2種以上を混合して用いられる。さらに、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでいてもよい。

【0086】

クリーム剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に溶解または乳化させて製造、調製される。クリーム基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。例えば、高級脂肪酸エステル、低級アルコール、炭化水素類、多価アルコール（プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール等）、高級アルコール（2-ヘキシルデカノール、セタノール等）、乳化剤（ポリオキシエチレンアルキルエーテル類、脂肪酸エステル類等）、水、吸収促進剤、かぶれ防止剤から選ばれるものの単独または2種以上を混合して用いられる。さらに、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでもよい。

【0087】

湿布剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に溶解させ、練合物とし支持体上に展延塗布して製造される。湿布基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。例えば、増粘剤（ポリアクリル酸、ポリビニルピロリドン、アラビアゴム、デンプン、ゼラチン、メチルセルロース等）、湿潤剤（尿素、グリセリン、プロピレングリコール等）、充填剤（カオリン、酸化亜鉛、タルク、カルシウム、マグネシウム等）、水、溶解補助剤、粘着付与剤、かぶれ防止剤から選ばれるものの単独または2種以上を混合して用いられる。さらに、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでもよい。

【0088】

貼付剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に溶解させ、支持体上に展延塗布して製造される。貼付剤用基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。例えば、高分子基剤、油脂、高級脂肪酸、粘着付与剤、かぶれ防止剤から選ばれるものの単独または2種以上を混合して用いられる。さらに、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでもよい。

【0089】

リニメント剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば

、ひとつまたはそれ以上の活性物を水、アルコール（エタノール、ポリエチレングリコール等）、高級脂肪酸、グリセリン、セッケン、乳化剤、懸濁化剤等から選ばれるもの単独または2種以上に溶解、懸濁または乳化させて製造、調製される。さらに、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでいてもよい。

【0090】

噴霧剤、吸入剤、およびスプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第 2,868,691 号および同第3,095,355 号に詳しく記載されている。また、エアゾル剤としても構わない。

【0091】

非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート80（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって製造、調製される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

【0092】

非経口投与のための点眼剤には、点眼液、懸濁型点眼液、乳濁型点眼液、用時溶解型点眼液および眼軟膏が含まれる。

【0093】

これらの点眼剤は公知の方法に準じて製造、調製される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。点眼剤の溶剤としては、例えば、滅菌精製水、生理食塩水、その他の水性溶剤または注

射用非水性用剤（例えば、植物油等）等およびそれらの組み合わせが用いられる。点眼剤は、等張化剤（塩化ナトリウム、濃グリセリン等）、緩衝化剤（リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、界面活性化剤（ポリソルベート 80（商品名）、ステアリン酸ポリオキシシル 40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等）、安定化剤（クエン酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム等）、防腐剤（塩化ベンザルコニウム、パラベン等）等などを必要に応じて適宜選択して含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか、無菌操作法によって製造、調製される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の滅菌精製水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

【0094】

非経口投与のための吸入剤としては、エアロゾル剤、吸入用粉末剤又は吸入用液剤が含まれ、当該吸入用液剤は用時に水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁させて使用する形態であってもよい。

【0095】

これらの吸入剤は公知の方法に準じて製造される。

【0096】

例えば、吸入用液剤の場合には、防腐剤（塩化ベンザルコニウム、パラベン等）、着色剤、緩衝化剤（リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、等張化剤（塩化ナトリウム、濃グリセリン等）、増粘剤（カリボキシビニルポリマー等）、吸収促進剤などを必要に応じて適宜選択して調製される。

【0097】

吸入用粉末剤の場合には、滑沢剤（ステアリン酸およびその塩等）、結合剤（デンプン、デキストリン等）、賦形剤（乳糖、セルロース等）、着色剤、防腐剤（塩化ベンザルコニウム、パラベン等）、吸収促進剤などを必要に応じて適宜選択して調製される。

【0098】

吸入用液剤を投与する際には通常噴霧器（アトマイザー、ネブライザー）が使用され、吸入用粉末剤を投与する際には通常粉末薬剤用吸入投与器が使用される。

【0099】

非経口投与のためその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される直腸内投与のための坐剤および腔内投与のためのペッサリー等が含まれる。

【0100】

【局所への適用】

本発明の局所投与としては、疾患の部位へプロスタグラン（PG）I₂アゴニストや他の薬剤（有効成分）を局所的に供給できればよく、その投与方法に限定されない。例えば、筋肉内、皮下、皮内、血管内、臓器、関節部位などへの注射剤、埋め込み剤、医療器具（ステント等）に有効成分をコーティングしたコーティング剤、顆粒剤、散剤等の固形製剤、貼付剤、ゲル剤、軟膏剤等が挙げられる。

【0101】

本発明の持続性製剤としては、疾患の部位で、有効成分を持続的に供給できればよく、その製剤に限定されない。例えば、徐放性注射剤（例えば、マイクロカプセル製剤、マイクロスフェア製剤、ナノスフェア製剤等）、埋め込み製剤（例えば、フィルム製剤等）、軟膏剤、医療器具（ステント等）に有効成分をコーティングしたコーティング剤等が挙げられる。

【0102】

本発明のマイクロカプセル製剤、マイクロスフェア製剤、ナノスフェア製剤とは、活性成分として有効成分を含有し、生体内分解性重合物との微粒子状の医薬組成物である。

【0103】

本発明の生体内分解性重合物とは、脂肪酸エステル重合体またはその共重合体、ポリアクリル酸エステル類、ポリヒドロキシ酪酸類、ポリアルキレンオキサレート類、ポリオルソエステル、ポリカーボネートおよびポリアミノ酸類が挙げられ、これらは1種類またはそれ以上混合して使用することができる。脂肪酸エステル重合体またはその共重合体とは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリクエン酸、ポリリンゴ酸および乳酸-グリコール酸共重合体が挙げられ、これらは1種

類またはそれ以上混合して使用することができる。その他に、ポリ α -シアノアクリル酸エステル、ポリ β -ヒドロキシ酪酸、ポリトリメチレンオキサート、ポリオルソエステル、ポリオルソカーボネート、ポリエチレンカーボネート、ポリ γ -ベンジル-L-グルタミン酸およびポリ-L-アラニンの1種類またはそれ以上混合も使用することができる。好ましくは、ポリ乳酸、ポリグルコール酸または乳酸-グリコール酸共重合体であり、より好ましくは、乳酸-グリコール酸共重合体である。

【0104】

本発明に使用されるこれらの生体内分解性高分子重合物の平均分子量は約2,000ないし約800,000のものが好ましく、より好ましくは約5,000ないし約200,000である。例えば、ポリ乳酸において、その重量平均分子量は約5,000から約100,000のものが好ましい。さらに好ましくは約6,000から約50,000である。ポリ乳酸は、自体公知の製造方法に従って合成できる。乳酸-グリコール酸共重合物においては、その乳酸とグリコール酸との組成比は約100/0から約50/50 (W/W) が好ましく、特に約90/10から50/50 (W/W) が好ましい。乳酸-グリコール酸共重合物の重量平均分子量は約5,000から約100,000が好ましい。さらに好ましくは約10,000から80,000である。乳酸-グリコール酸共重合物は、自体公知の製造方法に従って合成できる。

【0105】

本明細書中、重量平均分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) で測定したポリスチレン換算の分子量をいう。

【0106】

前記した生体内分解性高分子重合物は、本発明の目的が達成される限り、有効成分の薬理活性の強さと、目的とする薬物放出によって変えることができ、例えば当該生理活性物質に対して約0.2ないし10,000倍 (重量比) の量で用いられ、好ましくは約1ないし1,000倍 (重量比)、さらに好ましくは約1ないし100倍 (重量比) の量で用いるのがよい。

【0107】

本発明のマイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノカプセルは、例えば水中乾燥法（例えば、 o/w 法、 $w/o/w$ 法等）、相分離法、噴霧乾燥法、超臨界流体による造粒法あるいはこれらに準ずる方法などが挙げられる。

以下に、水中乾燥法（ o/w 法）と噴霧乾燥法について、具体的な製造方法を記述する。

（１）水中乾燥法（ o/w 法）本方法においては、まず生体内分解性重合物の有機溶媒溶液を作製する。本発明のマイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノカプセルの製造の際に使用する有機溶媒は、沸点が 120°C 以下であることが好ましい。該有機溶媒としては、例えばハロゲン化炭化水素（例、ジクロロメタン、クロロホルム等）、脂肪族エステル（例、酢酸エチル等）、エーテル類、芳香族炭化水素、ケトン類（アセトン等）等が挙げられる。これらは２種以上適宜の割合で混合して用いてもよい。有機溶媒は、好ましくはジクロロメタン、アセトニトリルである。有機溶媒は、好ましくはジクロロメタンである。生体内分解性重合物の有機溶媒溶液中の濃度は、生体内分解性重合物の分子量、有機溶媒の種類などによって異なるが、一般的には約 $0.01\sim 80\%$ （ v/w ）から選ばれる。好ましくは約 $0.1\sim 70\%$ （ v/w ）、さらに好ましくは約 $1\sim 60\%$ （ v/w ）である。

【0108】

このようにして得られた生体内分解性重合物の有機溶媒溶液中に、有効成分を、添加し溶解させる。この有効成分の添加量は、薬物の種類、血管形成作用および効果の持続時間等により異なるが、生体内分解性高分子重合物の有機溶媒溶液中の濃度として、約 $0.001\sim 90\%$ （ w/w ）、好ましくは約 $0.01\sim 80\%$ （ w/w ）、さらに好ましくは約 $0.3\sim 30\%$ （ w/w ）である。

【0109】

次いで、このようにして調製された有機溶媒溶液をさらに水相中に加えて、攪拌機、乳化機などを用いて o/w エマルジョンを形成させる。この際の水相体積は一般的には油相体積の約１倍～約 $10,000$ 倍から選ばれる。さらに好ましくは、約２倍～約 $5,000$ 倍から選ばれる。特に好ましくは、約５倍～約 $2,000$ 倍から選ばれる。前記外相の水相中に乳化剤を加えてもよい。乳化剤は、

一般的に安定な o/w エマルジョンを形成できるものであれば何れでもよい。乳化剤としては、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチンなどが挙げられる。これらは適宜組み合わせて使用してもよい。外水相中の乳化剤の濃度は、好ましくは約 0.001% ~ 約 20% (w/w) である。さらに好ましくは約 0.01% ~ 約 10% (w/w)、特に好ましくは約 0.05% ~ 約 5% (w/w) である。

【0110】

油相の溶媒の蒸発には、通常用いられる方法が採用される。該方法としては、攪拌機、あるいはマグネチックスターラー等で攪拌しながら常圧もしくは徐々に減圧して行うか、ロータリーエバポレーターなどを用いて、真空度を調節しながら行う。このようにして得られたマイクロスフェアは遠心分離法あるいは濾過して分取した後、マイクロスフェアの表面に付着している遊離の有効成分、乳化剤などを、例えば界面活性剤溶液またはアルコール等で数回繰り返し洗浄した後、再び、蒸留水または賦形剤（マンニトール、ソルビトール、ラクトース等）を含有した分散媒などに分散して凍結乾燥する。前記した o/w 法においては、有効成分を生体内分解性重合物の有機溶媒溶液中に分散させる方法、すなわち $s/o/w$ 法によりマイクロスフェアを製造してもよい。

(2) 噴霧乾燥法によりマイクロスフェアを製造する場合には、生体内分解性重合物と有効成分を溶解した有機溶媒またはエマルジョンを、ノズルを用いてスプレードライヤー装置（噴霧乾燥機）の乾燥室内へ噴霧し、きわめて短時間に微粒化液滴内の有機溶媒または水を揮発させマイクロスフェアを調製する。ノズルとしては、二液体ノズル型、圧力ノズル型、回転ディスク型等がある。このとき、所望により、 o/w エマルジョンの噴霧と同時にマイクロスフェアの凝集防止を目的として、有機溶媒または凝集防止剤（マンニトール、ラクトース、ゼラチン等）の水溶液を別ノズルより噴霧する事も有効である。このようにして得られたマイクロスフェアは、必要があれば加温し、減圧化でマイクロスフェア中の水分及び溶媒の除去をより完全に行う。

【0111】

フィルム製剤とは、前記の生体内分解性重合体と有効成分を有機溶媒に溶解した後、蒸留乾固し、フィルム状としたものまたは生体内分解性重合体と有効成分を適当な溶剤に溶かした後、増粒剤（セルロース類、ポリカーボネート類等）を加えて、ゲル化したもの等がある。

【0112】

本発明のマイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノスフェアは、例えばそのまま、あるいは球状、棒状、針状、ペレット状、フィルム状、クリーム状の医薬組成物を原料物質として種々の剤型に製剤化することもできる。

【0113】

また、この製剤を用いて、局所投与用の非経口剤（例、筋肉内、皮下、皮内、心筋内、腹腔内、気管支内、血管内、血管内皮損傷部位、脳内、髄内、硬膜内、硬膜外、関節部位、および各種臓器内などへの注射剤、埋め込み剤、顆粒剤、散剤等の固形製剤、懸濁剤等の液剤、貼付剤、フィルム製剤、軟膏剤等、医療器具（ステント等）に有効成分をコーティングしたコーティング剤等）などとして投与することもできる。例えば、マイクロスフェアを注射剤とするには、マイクロスフェアを分散剤、保存剤、等張化剤、緩衝剤、pH調整剤等と共に水性懸濁剤とすることにより実用的な注射用製剤が得られる。また、植物油あるいはこれにレシチンなどのリン脂質を混合したもの、あるいは中鎖脂肪酸トリグリセリド（例、ミグリオール 812 等）と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる注射剤とする。

【0114】

マイクロスフェアの粒子径は、例えば懸濁注射剤として使用する場合にはその分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば平均粒子径として約 0.1 ～ 約 300 μm の範囲が挙げられる。好ましくは、約 1 ～ 150 μm 、さらに好ましくは、約 2 ～ 100 μm の範囲の粒子径である。本発明の医薬組成物は、前記のように懸濁液であることが好ましい。本発明の医薬組成物は微粒子状であることが好ましい。なぜならば該医薬組成物は、通常の皮下あるいは筋肉内注射に使用される注射針を通して投与される方が、患者に対し過度の苦痛を与えることがないからである。本発明の医薬組成物は特に注射剤であることが好ましい。マイ

クロスフェアを無菌製剤にするには、製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

【0115】

本発明の医薬組成物は、有効成分の作用が徐放性を有し、生体内分解性重合物の種類、配合量などによりその徐放期間は異なるが、通常1週から3カ月の徐放期間を有するので、（虚血性）臓器障害部における内因性修復因子産生促進剤や血管新生促進剤として用いることができる。

【0116】

本発明の医薬組成物の投与量は、有効成分の種類と含量、剤型、薬物放出の持続時間、投与対象動物などにより異なるが、有効成分の有効量であればよい。例えばマイクロクロスフェアとして虚血部位に使用する場合、1回当たりの投与量として、成人（体重50kg）当たり、有効成分として約0.001mgから500mg。好ましくは約0.01mgから50mgを1週間ないし3カ月に1回投与すればよい。

【0117】

【実施例】

以下に、実施例として薬理試験を示すが、本発明をよく理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。なお、本発明の測定法は以下の如く本発明化合物を評価するために測定精度の向上および測定感度の改良を加えたものである。

実施例1：血管新生促進作用の測定 (in vitro)

〔実験方法〕

血管新生キット（倉敷紡績株式会社製；正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞と正常ヒト皮膚線維芽細胞から構成）を3時間培養し、その後に培養液（培養液は血管新生キットに付属する血管新生専用培地を使用し、37℃、5%二酸化炭素-95%空気、湿潤環境で培養し、培養機器は炭酸ガス培養器BNA-121Dを使用した。）を交換することにより、各ウェルに被験薬を添加した（0.5 mL/well）。培養開始3、6および8日後にも培養液交換を行なうことにより新しい被験薬を添加した。被験薬の種類および濃度は、無処置、DMSO 0.1%、化合物1 10^{-9} 、 10^{-8} および 10^{-7} mol/L、VEGF-A 0.1、1および10 ng/mL、HGF 0.1、1および10 ng/mLとし、各濃度

について3ウエルずつを用いて培養した。培養開始10日後に固定を行い、管腔染色キット（倉敷紡績株式会社製）を用いて抗CD31抗体により管腔の染色を行った。評価は、Chalkley Grid（グリッドレンズ、倉敷紡績株式会社）を顕微鏡の接眼レンズに装着しChalkley Gridのランダムに配置された点と形成された管腔との交点をカウントすることにより管腔形成を評価した（評価方法はJ Pathol., 177, 275-283 (1995)参照した）。カウントは1ウエルあたり12ヶ所行い、その和を求めた。

【0118】

なお、被験薬として、化合物1（（E）- [5- [2- [1-フェニル-1-（3-ピリジル）メチリデンアミノオキシ] エチル] -7, 8-ジヒドロナフタレン-1-イルオキシ酢酸）は、ジメチルスルフォキシド（DMSO）に溶解して、 10^{-4} 、 10^{-5} および 10^{-6} mol/L溶液を調整後、培養液で1/1000倍に希釈して使用した。

【0119】

VEGF-A (Vascular endothelial growth factor-A) は、倉敷紡績株式会社の血管新生コントロール試薬キットに含まれるVEGF2 μ g/mL液を培養液で希釈して使用した。

【0120】

HGF (Human hepatocyte growth factor) は、R&D system社—フナコシ株式会社から購入したHGF5 μ g/mL液を培養液で希釈して使用した。

〔統計解析方法〕

無処置のウエルの管腔形成のカウントと各濃度の被験薬を処置したウエルのそれとをDunnett検定（両側検定）により比較した。有意水準は5%とした。

【0121】

なお、データは3ウエルの平均値と標準偏差で示した。

【0122】

実験結果を図1に示す。

〔結果〕

化合物1は 10^{-8} および 10^{-7} mol/Lにおいて統計学的に有意に管腔形成を促進し

た。また、VEGF-AおよびHGFは10 ng/mLの濃度で管腔形成を促進した。以上の結果から、化合物1はヒト血管内皮細胞とヒト繊維芽細胞の共培養の系において陽性対照薬であるVEGF-AやHGFに匹敵する強さの血管新生促進作用を有することが明らかとなった。

実施例2：内因性修復因子（HGF、VEGF）蛋白産生作用の測定（in vitro）

〔実験方法〕

血管新生キット（倉敷紡績株式会社製；正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞と正常ヒト皮膚線維芽細胞から構成）を3時間培養し、その後に培養液（培養液は血管新生キットに付属する血管新生専用培地を使用し、37℃、5%二酸化炭素-95%空気、湿潤環境で培養し、培養機器は炭酸ガス培養器BNA-121Dを使用した。）を交換することにより、各ウェルに被験薬を添加した（0.5 mL/well）。被験薬および濃度はDMSO 0.1%、化合物1 10^{-7} mol/Lとし、各3ウェルずつ用いて培養した。培養開始前、開始後1、2、6、24、48および72時間後に培養上清を採取した。培養上清中のHGFおよびVEGF蛋白濃度はELISAキット（R&D system-フナコシ株式会社）を用いて測定した。

【0123】

なお、被験薬として、化合物1（（E）- [5- [2- [1-フェニル-1-（3-ピリジル）メチリデンアミノオキシ] エチル] -7, 8-ジヒドロナフタレン-1-イルオキシ酢酸）は、ジメチルスルフォキシド（DMSO）に溶解して、 10^{-4} mol/L溶液を調整後、培養液で1/1000倍に希釈して使用した。

〔統計解析方法〕

溶媒対象のウェルと被験薬を処置したウェルのそれとをDunnett検定（両側検定）により比較した。有意水準は5%とした。

【0124】

なお、データは3ウェルの平均値と標準偏差で示した。

【0125】

培養72時間後の実験結果を表1に示す。

【0126】

【表 1】

表 1

被験薬	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)
溶媒対照 (DMSO)	110±16	2004±76
化合物 1	518±15***	3034±30***

*** : p<0.001 vs 溶媒対照

【 0 1 2 7 】

[結果]

化合物 1 は 10^{-7} mol/L の濃度の 72 時間培養において溶媒対照に比して統計学的に有意に HGF 蛋白および VEGF 蛋白の産生を促進した。

実施例 3：持続性製剤の製造製剤例 1

ポリ乳酸-グリコール酸共重合体（以下、PLGA と略記する）（ポリ乳酸：グリコール酸＝1：1（モル％）、重量平均分子量 40,000、PLGA5-1、MITSUI TOATSU CHEMICALS）100mg と化合物 1（5mg）のジクロロメタン（1mL）溶液を調製した。TK ロボミックス（特殊機化、MARK II 2.5 型）を用いて、5,000rpm で攪拌した 0.1％ポリビニルアルコール（ナカライテスク株式会社）水溶液（pH3.0、1N 塩酸により調整）300mL 中に、上記で調製した溶液を加え、室温で 3 分間攪拌し、O/W エマルジョンとした。この O/W エマルジョンを室温で 2 時間攪拌し、ジクロロメタンを揮発させ、油相を固化させた後、遠心分離器（日立、05PR-22）を用いて、3,000rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除き、注射用蒸留水（35mL）で分散後、遠心分離器を用いて、3,000rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除き、0.2％Tween 80 液（35mL）で分散後、遠心分離器を用いて、3,000rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除き、注射用蒸留水（35mL）で分散後、再び遠心分離器を用いて、3,000rpm で 10 分間遠心分離した。最終的に上清を除き、沈殿物をドライアイス-メタノールに浸し、凍結後、減圧下で乾燥させることによって、化合物 1 のマイクロスフェア製剤を製造した。

製剤例 2

ポリ乳酸-グリコール酸共重合体（以下、PLGAと略記する）（ポリ乳酸：グリコール酸＝1：1（モル％）、重量平均分子量20,000、PLGA5020、和光純薬工業株式会社）100mgと化合物1（5mg）のジクロロメタン（1mL）溶液を調製した。それ以降の操作は製剤例1と同様に行なうことにより、化合物1のマイクロスフェア製剤を製造した。

製剤例 3

ポリ乳酸-グリコール酸共重合体（以下、PLGAと略記する）（ポリ乳酸：グリコール酸＝1：1（モル％）、重量平均分子量40,000、PLGA5-1、MITSUI TOATSU CHEMICALS）100mgと化合物1（5mg）のジクロロメタン（3mL）溶液を調製した。それ以降の操作は製剤例1と同様に行なうことにより、化合物1のマイクロスフェア製剤を製造した。

製剤試験例 1（封入効率測定）

製剤例1、2および3で製造したマイクロスフェア（それぞれ約10mg）に適当な内部標準含有のアセトニトリル溶液を加えて、超音波処理し、溶解した。この各溶液中の化合物1の含有量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定し、マイクロスフェア中の化合物1の封入効率を次式により算出した。

【0128】

測定含有量／理論上の含有量×100

その結果、製剤例1のマイクロスフェア製剤は70.9%の封入効率であり、製剤例2のマイクロスフェア製剤は100%の封入効率であり、製剤例3のマイクロスフェア製剤は74.3%の封入効率であった。

製剤試験例 2（in vitroリリース試験）

製剤例1、2および3で製造したマイクロスフェア製剤を、薬物として100 μ g/mLになるように0.2%Tween80 1/15M pH6.8 リン酸緩衝液に加えて、超音波処理とボルテックスにて均一に分散させた。1mLずつ容器に小分けして充填し、37℃恒温槽に入れた。経時的に容器ごとサンプリングを行って12,000rpmで5分間遠心分離し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によってペレット中のマイクロスフェア内の化合物1の残存量を測定した。

【0129】

製剤例 1 で製造したマイクロスフェア製剤の結果を図 2 に、製剤例 2 で製造したマイクロスフェア製剤の結果を図 3 に、製造例 3 で製造したマイクロスフェア製剤の結果を図 4 に示す。

【0130】

なお、図 2、3 および 4 中の残存率とは、イニシャルに対する、マイクロスフェア中に残存している化合物 1 の比率を意味する。

【0131】

その結果、製剤例 1 のマイクロスフェア製剤は 14 日間で約 40% をリリースした。製剤例 2 のマイクロスフェア製剤は約 10 日間で全量をリリースした。製剤例 3 のマイクロスフェア製剤は 28 日間で約 60% をリリースした。

実施例 4：閉塞性動脈硬化症 (ASO) モデルを用いた血管新生試験 (in vivo 試験)

ラット左大腿動静脈を結紮し、ASO モデルを作製した。作製 2 週間後に Laser Doppler Imager (Moor Instruments) を用いて後肢の血流量を測定し、血流量の平均値がほぼ均等になるよう 6 群 (n=5) に群分けした。

【0132】

群分け翌日より被験液を 1 週間に 1 回、計 4 回、左大腿部内転筋に 0.1 mL/site、2site 被験物質を筋肉内投与した。最終投与終了日から 1 週間後に Laser Doppler Imager (Moor Instruments) を用いて後肢の血流量を測定し、処置足 (左足) と無処置足 (右足) の血流量を比較検討した。結果を表 2 に示す。

【0133】

なお、被験液の構成は以下の通りである。

溶媒 (Control) 群: 0.2 w/v% Tween 80 溶液 (0.2mL)。

ポリマー (Polymer) 群: 製剤例 1 で使用したポリ乳酸-グリコール酸共重合体を 0.2 w/v% Tween 80 溶液 (0.2mL) に懸濁した。なお、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の量は、化合物 1 MS (1mg) に含まれる量と同じである。

化合物 1 (1mg) 群: 化合物 1 (1mg) を 0.2 w/v% Tween 80 溶液 (0.2mL) に懸濁した。

化合物 1 MS (0.01mg) 群: 化合物 1 が 0.01mg 含まれる、製剤例 1 で製造したマイ

クロスフェア製剤を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.2mL) に懸濁した。

化合物 1 MS (0.1mg) 群: 化合物 1 が0.1mg含まれる、製剤例 1 で製造したマイクロ
クロスフェア製剤を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.2mL) に懸濁した。

化合物 1 MS (1mg) 群: 化合物 1 が1mg含まれる、製剤例 1 で製造したマイクロ
クロスフェア製剤を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.2mL) に懸濁した。

【0134】

【表 2】

表 2

被験液	処置足／無処置足の血流量比 (%)
Control	67.3 ± 5.1
Polymer	68.7 ± 4.1
化合物 1 (1mg)	76.2 ± 2.8 ^{**##}
化合物 1 MS (0.01mg)	74.0 ± 7.1
化合物 1 MS (0.1mg)	78.3 ± 4.6 ^{**##}
化合物 1 MS (1mg)	89.0 ± 4.4 ^{**##\$\$}

****:** significant difference from Control at p<0.01 (Student's t-test)

##: significant difference from Polymer at p<0.01 (Student's t-test)

\$\$\$: significant difference from 化合物 1 (1mg) at p<0.01 (Student's t-test)

【0135】

[結果]

化合物 1 (1mg) のみの投与でもControlに対し、有意な血流量の回復が見られたが、化合物 1 のマイクロクロスフェア (MS) 製剤を投与することにより、化合物 1 (1mg) に比し、さらに強力な血流量改善効果が認められた。

【0136】

化合物 1 MS製剤はポリマー群に比し、用量相関的に血流量改善効果が認められ、化合物 1 MS (0.1mg) および化合物 1 MS (1mg) においては有意な血流量改善効果作用が認められた。

実施例 5：閉塞性動脈硬化症（ASO）モデルを用いた血管新生試験；最小有効投与量の決定（in vivo試験）

ラット左大腿動静脈を結紮し、ASOモデルを作製した。作製1週間後にLaser Doppler Imager (Moor Instruments)を用いて後肢の血流量を測定し、血流量の平均値がほぼ均等になるよう4群 (n=5) に群分けした。

【0137】

群分け翌日より被験液を1週間に1回、計4回、左大腿部内転筋（ポリマー群、化合物1MS群）に0.1 mL/site、2site被験物質を筋肉内投与した。最終投与終了日から1週間後にLaser Doppler Imager (Moor Instruments)を用いて後肢の血流量を測定し、処置足（左足）と無処置足（右足）の血流量を比較検討した。結果を表3に示す。

【0138】

なお、被験液の構成は以下の通りである。

ポリマー（Polymer）群：製剤例1で使用したポリ乳酸-グリコール酸共重合体を0.2 w/v% Tween 80溶液（0.2mL）に懸濁した。なお、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の量は、化合物1MS（0.1mg）に含まれる量と同じである。

化合物1MS（0.03mg）群：化合物1が0.03mg含まれる、製剤例1で製造したマイクロスフェア製剤を0.2 w/v% Tween 80溶液（0.2mL）に懸濁した。

化合物1MS（0.1mg）群：化合物1が0.1mg含まれる、製剤例1で製造したマイクロスフェア製剤を0.2 w/v% Tween 80溶液（0.2mL）に懸濁した。

化合物1MS（0.3mg）群：化合物1が0.3mg含まれる、製剤例1で製造したマイクロスフェア製剤を0.2 w/v% Tween 80溶液（0.2mL）に懸濁した。

【0139】

【表 3】

表 3

被験液	処置足／無処置足の血流量比 (%)
Polymer	57.3±4.5
化合物 1 MS (0.03mg)	65.1±3.7*
化合物 1 MS (0.1mg)	68.4±3.2**
化合物 1 MS (0.3mg)	72.7±4.6**

*: p<0.05 vs Polymer (Student's t-test)

**: p<0.01 vs Polymer (Student's t-test)

【0140】

[結果]

化合物 1 のマイクロスフェア (MS) 製剤はポリマー群に比し、用量相関的に血流量改善効果が認められ、化合物 1 MS (0.03mg) から有意な血流量改善効果作用が認められた。よって、実施例 4 により化合物 1 MS (0.01mg) では有意な血流量改善効果作用が認められなかったことから、最小有効投与量は 0.03mg と示唆された。

実施例 6：閉塞性動脈硬化症 (ASO) モデルを用いた血管新生試験；局所投与の有用性 (in vivo 試験)

ラット左大腿動静脈を結紮し、ASO モデルを作製した。作製 1 週間後に Laser Doppler Imager (Moor Instruments) を用いて後肢の血流量を測定し、血流量の平均値がほぼ均等になるよう 4 群 (n=5) に群分けした。

【0141】

群分け翌日より被験液を 1 週間に 1 回、計 4 回、左大腿部内転筋 (ポリマー群、化合物 1 群、化合物 1 MS 群) および右肩胛腕部 (化合物 1 MS 群) に 0.1 mL/site、2site 被験物質を筋肉内投与した。最終投与終了日から 1 週間後に Laser Doppler Imager (Moor Instruments) を用いて後肢の血流量を測定し、処置足 (左足) と無処置足 (右足) の血流量を比較検討した。結果を表 4 に示す。

【0142】

なお、被験液の構成は以下の通りである。

ポリマー (Polymer) 群：製剤例 1 で使用したポリ乳酸-グリコール酸共重合体を 0.2 w/v% Tween 80 溶液 (0.2mL) に懸濁した。なお、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の量は、化合物 1 MS (1mg) に含まれる量と同じである。

化合物 1 (0.1mg) 群：化合物 1 (0.1mg) を 0.2 w/v% Tween 80 溶液 (0.2mL) に懸濁した。

化合物 1 MS (0.1mg) 群：化合物 1 が 0.1mg 含まれる、製剤例 1 で製造したマイクロスフェア製剤を 0.2 w/v% Tween 80 溶液 (0.2mL) に懸濁した。

【0143】

【表 4】

表 4

被験液	処置足／無処置足の血流量比 (%)
Polymer ^{a)}	57.3 ± 4.5
化合物 1 (0.1mg) ^{a)}	60.5 ± 3.1
化合物 1 MS (0.1mg) ^{b)}	56.9 ± 5.6
化合物 1 MS (0.1mg) ^{a)}	68.4 ± 3.2*

a) : 左虚血大腿部に筋肉内投与した

b) : 右正常上腕部に筋肉内投与した

* : p<0.01 vs polymer (Student's t-test)

【0144】

【結果】

化合物 1 MS (0.1mg) の右正常上腕部への筋肉内投与は有意な血流量の増加は認められなかったが、同量の左虚血大腿部への筋肉内投与は有意な血流量の増加が認められた。このことより、化合物 1 の有効性は血流を介したのではなく、虚血部位への局所投与の重要性が示唆された。また、化合物 1 の虚血部位への局所投与では有意な血流量の増加作用は認められず、持続性製剤 (MS) の有効性が示唆された。

実施例 7 : 閉塞性動脈硬化症 (ASO) モデルを用いた血管新生試験；血管拡張作

用と血管新生促進作用 (in vivo試験)

ラット左大腿動静脈を結紮し、ASOモデルを作製した。作製1週間後にLaser Doppler Imager (Moor Instruments)を用いて後肢の血流量を測定し、血流量の平均値がほぼ均等になるよう2群 (n=5) に群分けした。

【0145】

群分け翌日より被験液を1週間に1回、計4回、左大腿部内転筋（ポリマー群、化合物1MS群）に筋肉内投与した。2回目投与3日後（群分け後10日目）、最終投与終了日から1週間後および2週間後にLaser Doppler Imager (Moor Instruments)を用いて後肢の血流量を測定し、処置足（左足）と無処置足（右足）の血流量を比較検討した。結果を表5に示す。

【0146】

なお、被験液の構成は以下の通りである。

ポリマー (Polymer) 群：製剤例1で使用したポリ乳酸-グリコール酸共重合体を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.2mL) に懸濁した。なお、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の量は、化合物1MS (0.1mg) に含まれる量と同じである。

化合物1 (0.3mg) 群：化合物1 (0.3mg) を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.2mL) に懸濁した。

【0147】

【表5】

表5

被験液	処置足／無処置足の血流量比 (%)		
	2回目投与 3日後	4回目投与 1週間後	4回目投与 2週間後
Polymer	49.8±5.8	57.3±4.5	61.3±2.5
化合物1MS(0.3mg)	59.9±3.7*	72.7±4.6*	72.4±5.7**

* : p<0.05 vs Polymer (Student's test)

** : p<0.01 vs Polymer (Student's test)

【0148】

[結果]

化合物 1 MS (0.3 mg) は、初回投与後10日目 (2回目投与3日後) で虚血部位においても10%程度の有意な血流量の増加が認められた。血管新生には4週間程度の期間が必要なこと、および2回目投与3日後では化合物 1 が放出中であることから、この改善効果はスローリリースされた化合物 1 の血管拡張作用および血小板凝集抑制作用等の直接作用による血流量増加効果であることが示唆された。また、最終投与後1週間および2週間においても共に11%程度の有意な血流量増加作用を示した。最終投与1週間においてはマイクロスフェア製剤からの化合物 1 のリリースは完全に消失していることから、この効果は化合物 1 の直接作用 (血管拡張作用、血小板凝集抑制作用等) ではなく、血管新生作用による効果であることが示唆された。

実施例 8: マウススポンジ移植モデルを用いた血管新生試験 (in vivo試験)

麻酔下、マウスの背部を切開し、円盤状ウレタン製スポンジ (厚さ約5 mm、直径13 mm) を埋め込んだ。薬剤投与はスポンジ移植モデル作製日 (手術終了後) から1日1回、計14回、または手術終了後および7日後の計2回、直接スポンジ内に局所投与した。スポンジ移植後15日後に、肉芽組織を含むスポンジを摘出し、肉眼観察後、湿重量を測定した。湿重量の4倍量の蒸留水を加えホモジナイズし、遠心分離後、上清をヘモグロビン β -テストワコー (和光純薬製) を用いて、ヘモグロビン含量を測定した。結果を表 6 に示す。

【0149】

なお、被験液の構成は以下の通りである。

ポリマー (Polymer) 群: 製剤例 1 で使用したポリ乳酸-グリコール酸共重合体を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.05mL) に懸濁した。なお、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の量は、化合物 1 MS (200 μ g) に含まれる量と同じである。

化合物 1 (20 μ g) 群: 化合物 1 (20 μ g) を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.05mL) に懸濁した。

化合物 1 (40 μ g) 群: 化合物 1 (40 μ g) を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.05mL) に懸濁した。

化合物 1 (200 μ g) 群: 化合物 1 (200 μ g) を0.2 w/v% Tween 80溶液 (0.05mL) に懸濁した。

化合物 1 MS (200 μ g) 群: 化合物 1 が 200 μ g 含まれる、製剤例 1 で製造したマイクロスフェア製剤を 0.2 w/v% Tween 80 溶液 (0.05 mL) に懸濁した。

化合物 1 MS (400 μ g) 群: 化合物 1 が 400 μ g 含まれる、製剤例 1 で製造したマイクロスフェア製剤を 0.2 w/v% Tween 80 溶液 (0.05 mL) に懸濁した。

【0150】

【表 6】

表 6

被験液	スポンジ湿重量 (g)	ヘモグロビン含量 (mg/g wet tissue)
Polymer ^{b)}	0.4542 \pm 0.0303	1.973 \pm 0.564
化合物 1 (20 μ g) ^{a)}	0.3843 \pm 0.0681	2.403 \pm 0.533
化合物 1 (40 μ g) ^{a)}	0.5136 \pm 0.0938	3.010 \pm 0.808
化合物 1 (200 μ g) ^{b)}	0.4123 \pm 0.0320	1.964 \pm 0.289
化合物 1 MS (200 μ g) ^{b)}	0.5317 \pm 0.1413	3.523 \pm 0.482**
化合物 1 MS (400 μ g) ^{b)}	0.5655 \pm 0.1130	4.822 \pm 1.218**

a): 1日1回14日間反復投与

b): 7日間隔2回投与

** : p<0.01 vs Polymer

【0151】

【結果】

化合物 1 MS (200 μ g) (7日間隔2回投与) および化合物 1 MS (400 μ g) (7日間隔2回投与) が投与されたスポンジは、肉芽形成が認められ、淡赤色、赤色または暗褐色を呈していた。また、スポンジに形成された肉芽組織中ヘモグロビン濃度を測定した結果、ポリマー群と比較し有意なヘモグロビン濃度の増加が観察され、血管新生効果が認められた。一方、化合物 1 (20 μ g) (14日間反復投与) および化合物 1 (40 μ g) (14日間反復投与) においては、スポンジに形成された肉芽組織中ヘモグロビン濃度は増加傾向にあったが、有意な増加ではなかった。また、化合物 1 (200 μ g) (7日間隔2回投与) においては、スポンジに

形成された肉芽組織中ヘモグロビン濃度は全く増加していなかった。このことから、血管新生を誘導するには化合物 1 のスローリリース製剤（化合物 1 MS）が特に有用であることがわかった。

【0152】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 化合物 1 の血管新生促進作用の測定結果を示す。

【図 2】 製剤例 1 で製造したマイクロスフェア製剤のリリース試験結果を示す

。

【図 3】 製剤例 2 で製造したマイクロスフェア製剤のリリース試験結果を示す

。

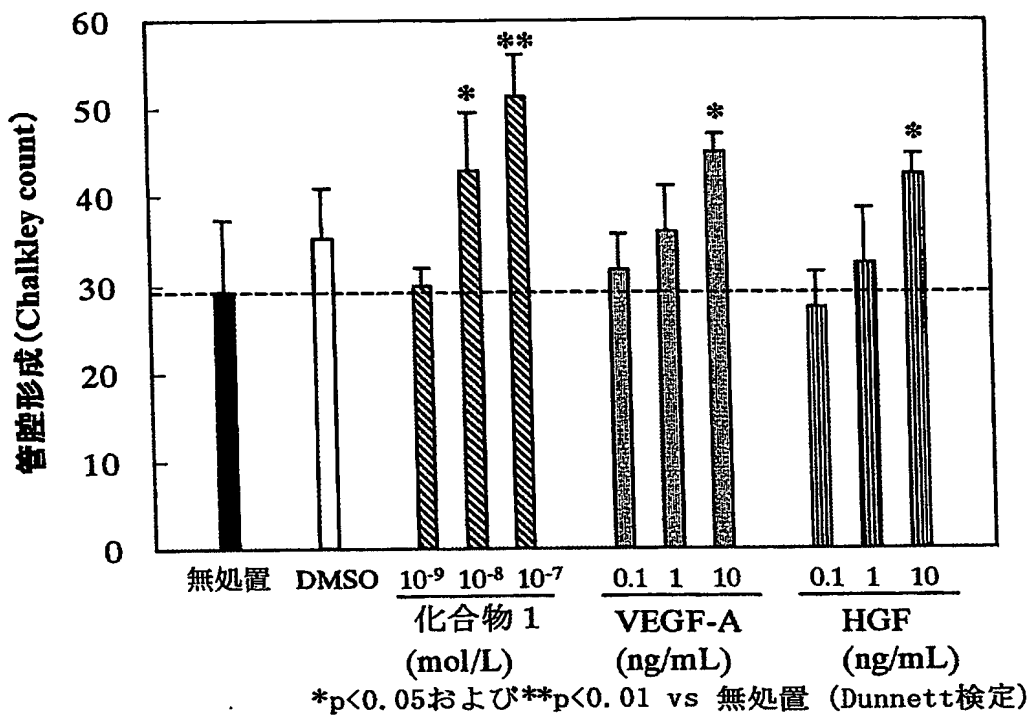
【図 4】 製剤例 3 で製造したマイクロスフェア製剤のリリース試験結果を示す

。

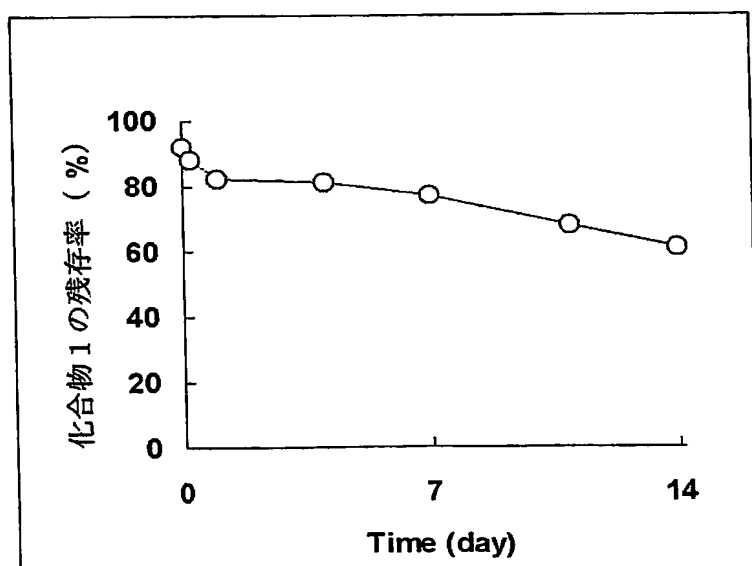
【書類名】

図面

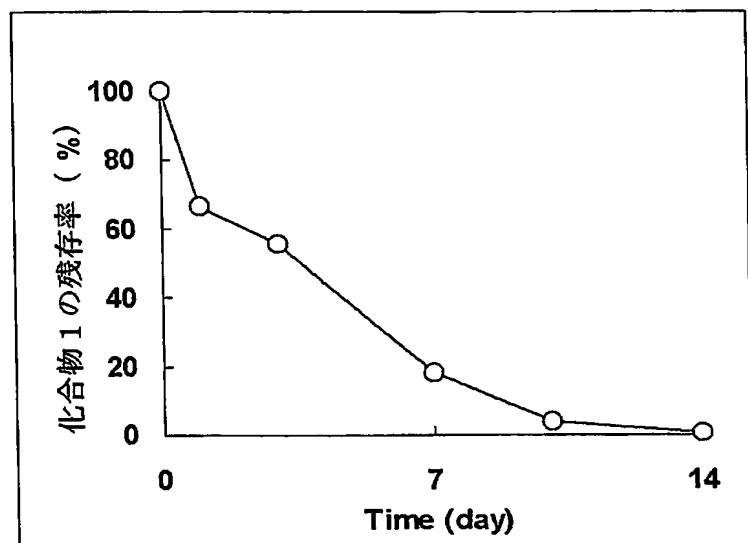
【図1】



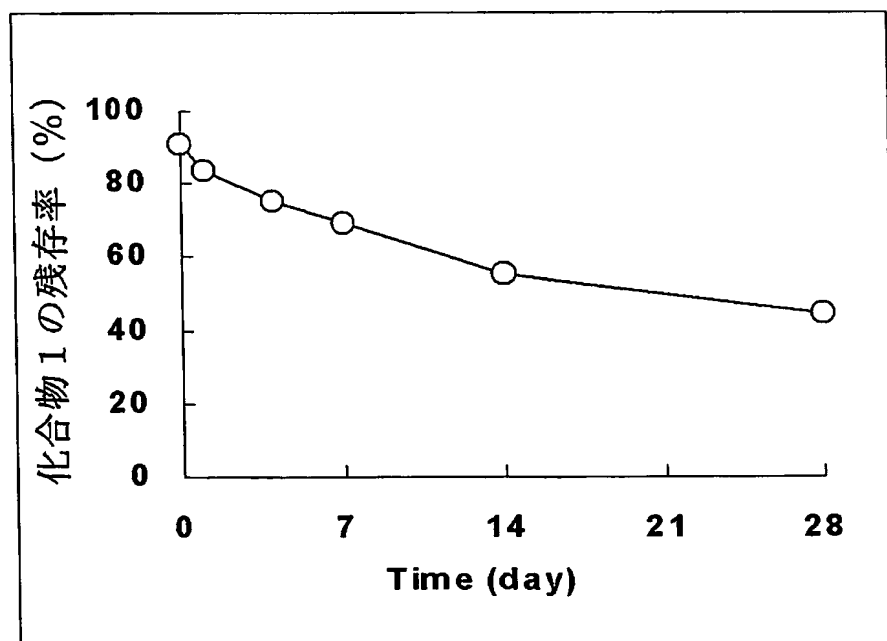
【図2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 プロスタグランジン（P G） I 2 アゴニストを有効成分とする内因性修復因子産生促進剤および血管新生促進剤。

【効果】 プロスタグランジン（P G） I 2 アゴニストは内因性修復因子の産生促進作用や血管新生促進作用を有するため、虚血性臓器障害（閉塞性動脈硬化症、バージャー病、レイノー病、心筋梗塞、狭心症、糖尿病性神経障害、脊柱管狭窄症、脳血管障害、脳梗塞、またはパーキンソン病等）等の予防や治療に有用である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-117604
受付番号	50300671549
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 4月23日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 4月22日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-117604

出願人履歴情報

識別番号

[000185983]

1. 変更年月日

1990年 9月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号

氏 名

小野薬品工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.